

# VIABILITAS PROBIOTIK *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 SETELAH MIKROENKAPSULASI

Benni James Stepen Silaban<sup>1), 2)</sup>, Lany Nurhayati<sup>1)\*</sup>, Apriliana Wahyu Hartanti<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Nusa Bangsa,  
Jl. Sholeh Iskandar Km 4, Tanah Sereal, Bogor 16166

<sup>2)</sup>Departemen Metabolic Engineering, PT.Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences (DLBS),  
Jl. Industri Selatan V, Blok PP No.7, Kawasan Industri Jababeka II, Cikarang 17550

\* e-mail: [lany@unb.ac.id](mailto:lany@unb.ac.id)

## ABSTRACT

### *Viability of Lactobacillus acidophilus DLBSD102 after Microencapsulation*

Probiotic food products began liked by the public healthy, but they have unstabil of the viability for amount of bacteria dan life time. This study was aim to select encapsulant material were maltodextrin, whey protein isolate, and inulin for the viability the *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 during the spray drying method. Since spray drying process use the high temperature, suitable encapsulation material will increase the viability of probiotic and the quality of the final product. The spray drying temperature used was 130°C (inlet) and 60°C (outlet). The quality of the fermented milk powder containing *L.acidophilus* DLBSD102 bacteria strain was evaluated by measure the bacterial viability, bacterial cell resistance from hot temperatures, bile salts (0.5%) low pH (pH 2.0), and the presence of possible pathogenic bacteria. The results showed that the additional encapsulation material of inulin yielded a good quality fermented milk powder, compared with a mixture of encapsulation materials of maltodextrin: whey protein isolate (3:1). The addition of encapsulation material in the form of inulin yielded viability of BAL with log decrease of  $0.20 \pm 0.01$  log CFU/g whereas without inulin addition decreased by  $0.51 \pm 0.36$  log CFU/g when dried. Therefore, the mixture of encapsulation materials is used in the microencapsulation process of BAL by yielding 8.93% heat resistance, bile salt resistance of 78.55%, resistance to pH 2 of 77.25%, total titrated acids by 2.38%, moisture content during storage of 4.33% (4°C) and 3.96% (25°), pH value during fermentation process was  $3.59 \pm 0.35$  and no pathogenic bacteria was detected during production, packaging and storage for 4 weeks.

Keywords: *L. acidophilus* DLBSD102, microencapsulation, enkapsulation material, spray drying.

## ABSTRAK

Produk pangan probiotik mulai disukai oleh masyarakat milenial, namun viabilitas mikroba yang ada sering tidak stabil dalam jumlah dan waktu penyimpanan, sehingga perlu disalut menggunakan mikroenkapsulan. Penelitian ini tentang viabilitas *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 menggunakan bahan enkapsulan yang sesuai dengan metode pengeringan semprot (*spray drying*). Tujuannya mengetahui perbandingan konsentrasi enkapsulasi yang terdiri atas maltodekstrin, whey protein isolate, serta penambahan inulin terhadap viabilitas *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 setelah proses pengeringan semprot. Suhu yang digunakan adalah 130°C (*inlet*) dan 60°C (*outlet*). Bahan enkapsulan adalah campuran dari maltodekstrin:whey protein isolate:inulin (3:1:1). Evaluasi kualitas serbuk susu fermentasi yang diperoleh yaitu viabilitas, ketahanan sel bakteri terhadap suhu panas, garam empedu (0,5%), pH rendah (pH 2,0) dengan metode cawan tuang, dan evaluasi bakteri patogen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bahan enkapsulan tambahan berupa inulin menghasilkan serbuk susu fermentasi dengan kualitas yang baik, dibandingkan dengan campuran bahan enkapsulan berupa maltodekstrin:whey protein isolate (3:1). Penambahan bahan enkapsulan berupa inulin menghasilkan viabilitas BAL dengan log penurunan sebesar  $0,20 \pm 0,01$  log CFU/g, sedangkan tanpa penambahan inulin turun sebesar  $0,51 \pm 0,36$  log CFU/g saat dikeringkan. Oleh sebab itu, campuran bahan enkapsulan yang digunakan dalam proses mikroenkapsulasi BAL menghasilkan ketahanan terhadap panas sebesar 8,93%, ketahanan terhadap garam empedu sebesar 78,55%, ketahanan terhadap pH 2 sebesar 77,25%, total asam tertirasi sebesar 2,38%, kadar air selama penyimpanan sebesar 4,33% (4°C) dan 3,96% (25°), nilai pH selama proses fermentasi sebesar  $3,59 \pm 0,35$ . Dan, serbuk susu fermentasi tidak mengandung bakteri patogen selama proses produksi, pengemasan hingga penyimpanan selama 4 minggu.

Kata kunci: Probiotik *L. acidophilus* DLBSD102, mikroenkapsulasi, bahan enkapsulan

## PENDAHULUAN

Seiring dengan banyaknya konsumsi obat-obatan bagi para konsumen yang

mengeluhkan sakit seperti diare, gejala *irritable bowel syndrome* (IBS) akibat antibiotik dan gaya hidup yang tidak sehat. Hal tersebut menyebabkan mulai beralihnya

konsumsi makanan dari yang tidak sehat menjadi sehat, salah satunya dengan adanya produk-produk hasil fermentasi dari bakteri asam laktat yang bersifat menguntungkan bagi tubuh.

Berdasarkan laporan pasar yang diterbitkan oleh *Market Research Transparansi*, menyatakan bahwa pasar probiotik secara global dilihat, dari Laju Pertumbuhan Majemuk Tahunan (*Compound Annual Growth Rate*) (CAGR) mengalami peningkatan. Tingkat penjualan produk pangan probiotik, suplemen dan makanan mengalami peningkatan dari US\$ 62,6 miliar pada tahun 2014 dan akan terus meningkat sebesar 7,40% selama periode 8 tahun sebelumnya dan diperkirakan akan mencapai US\$ 96 miliar pada tahun 2020 (Pedretti, 2013).

Probiotik merupakan mikroba hidup yang berfungsi menjaga keseimbangan mikroflora usus. Efek positif probiotik terhadap kesehatan inangnya khususnya manusia telah banyak dibuktikan sebelumnya, seperti meningkatkan respon sel imun, menurunkan kadar mutagen atau karsinogen, menurunkan kadar kolesterol darah dan memperbaiki toleransi terhadap laktosa (Fuller, 1991). Untuk dapat berfungsi dengan baik, probiotik harus dapat mempertahankan viabilitasnya dalam jumlah dan waktu tertentu Salminen *et al*, (1998). Salah satu usaha dalam menjaga viabilitas bakteri selama proses produksi, pengemasan dan penyimpanan yaitu dengan metode mikroenkapsulasi.

Mikroenkapsulasi merupakan teknik penyalutan bahan inti yang dari sampel padatan ataupun cairan. Enkapsulasi bertujuan melindungi bahan inti dari kehilangan zat penting, menjaga bahan aktif, memudahkan pelepasan bahan inti dan melindungi komponen aktif dari lingkungan luar (Kondo, 1979). Bahan-bahan enkapsulasi diantaranya berbagai jenis polisakarida seperti pati, maltodekstrin, inulin, alginat, gum arab, gelatin, karagenan, dan protein seperti albumin, kasein, dan *whey protein isolate*, dan penggunaannya perlu diperhatikan, karena masing-masing bahan mempunyai karakter yang berbeda dan belum tentu cocok dengan bahan inti

yang akan dienkapsulasi (Desmond *et al*, 2002).

Berbagai penelitian mengenai pengaruh mikroenkapsulasi, telah dilakukan sebelumnya dengan bahan enkapsulan yang berbeda-beda dan hasil yang beragam. Penelitian oleh Sultana *et al*, (2000) dan Soukoulis *et al*, (2013) menemukan bahwa mikroenkapsulasi menggunakan kombinasi alginat-pati atau *whey protein* mampu meningkatkan viabilitas dan ketahanan *L.acidophilus*.

Penelitian Yonekura *et al*, (2013) menyatakan bahwa enkapsulasi menggunakan *hydroxypropyl methyl cellulose* (HPMC) tidak berpengaruh signifikan terhadap viabilitas dan ketahanan terhadap panas selama proses pengeringan semprot. Umumnya enkapsulasi menggunakan bahan protein diketahui mampu meningkatkan ketahanan penyimpanan setelah dienkapsulasi (Soukoulis *et al*, (2013) dan Jiang *et al*, (2016), sedangkan enkapsulasi menggunakan polisakarida berpengaruh pada tekstur dan ketahanan didalam saluran pencernaan.

Maltodekstrin dengan rumus umum  $[(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O]$  merupakan bahan dari hasil hidrolisis pati dengan ikatan glikosidik (1-4)  $\alpha$ -D-glukosa. Maltodekstrin dihasilkan melalui proses hidrolisis dengan bantuan enzim ( $\alpha$ -amilase) atau asam (Kennedy *et al*, 1995), memiliki *Dextrose Equivalent* (DE) kurang dari 20. DE menunjukkan persentase dari dextrose murni dalam produk kering.

*Whey protein isolate* merupakan protein nonkasein yang berasal dari total protein susu skim. *Whey protein isolate* banyak digunakan karena mampu melindungi dinding sel bakteri, menjaga kestabilan dan ketahanan protein terhadap suhu panas pada proses enkapsulasi dengan metode pengeringan semprot (Young *et al*, 1993).

Inulin merupakan serat pangan dengan komposisi berupa oligosakarida (monomer berupa fruktosa) berasal dari umbi-umbian, memiliki kandungan serat tinggi dan banyak digunakan, karena mampu mengurangi resiko kanker usus besar dan menormalkan kadar gula darah pada tubuh. Inulin merupakan serat pangan sulit

dihidrolisis oleh enzim tubuh manusia, tapi dapat difermentasi di saluran usus dengan bantuan mikroflora, dan membantu kinerja dari usus dan lemak darah. Proses fermentasi inulin dengan bantuan *Bifidobacteria* dan *Lactobacilli* mampu menghasilkan asam lemak rantai pendek berupa asam asetat, propionat, L-laktat, butirir yang bermanfaat bagi tubuh manusia dengan perbandingan bahan enkapsulan 3:1:1 (Young *et al*, 1993). Tujuan penelitian ini adalah mengetahui perbandingan konsentrasi enkapsulasi yang terdiri atas maltodekstrin, *whey protein isolate*, serta penambahan inulin yang berpengaruh terhadap viabilitas *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 setelah proses pengeringan semprot (*spray drying*).

## BAHAN DAN METODE

Bahan-bahan yang digunakan terdiri dari kultur starter bakteri *L. acidophilus* DLBSD102 koleksi dari Laboratorium Metabolic Engineering DLBS, air *reverse osmosis* (RO), instan skim milk powder, sukrosa, maltodekstrin, inulin dan *whey protein isolate*, larutan novobiocin, de Man rogosa sharpe broth (MRSB), de Man rogosa sharpe agar (MRSA), *sodium peptone broth* (Merck), NaCl 0,85% (Oxoid), *polysorbate* (Tween 80), *tryptic soy broth* (TSB), *macconkey broth* (MCB), *rappaport vassiliadis salmonella enrichment broth* (RVS), *xylose lysine deoxycholate agar* (XLDA), *cetrimide agar* (CA), *mannitol salt phenol red agar* (MSA).

Alat-alat yang digunakan terdiri peralatan gelas, *autoclave* Hirayama, shaker inkubator Innova 40, sentrifuga Kubota 7780, *scanning electron microscope* (SEM) JSM-6510, kemasan aluminium foil berlapis *low density polyethylene* (LDPE), mikropipet Eppendorf, *sealer vacuum*, neraca analitik Mettler Toledo AB-245, pengering semprot (*spray dryer*) CNK-5000-3, *laminar air flow* Airegard, *biosafety cabinet* Thermo Scientific, pH meter Toledo, fermentor New Brunswick dan spektrofotometer Biorad.

## Penentuan Kurva Pertumbuhan Kultur *L.acidophilus* DLBSD102 (Apriyantono *et al*, 1989) dengan modifikasi

Pengukuran kurva pertumbuhan *L.acidophilus* DLBSD102 dilakukan pada dua jenis media yaitu media MRS broth (*de Man Rogosa Sharpe Broth*) dan media susu 100 mL. Pengukuran pertumbuhan pada kedua media dilakukan berdasarkan perhitungan koloni dengan metode cawan tuang menggunakan media MRS agar. Kekeruhan yang diukur  $\lambda$  600 nm untuk media MRS broth. Pengukuran dilakukan setiap dua jam sekali selama 24 jam. Kultur bakteri yang digunakan dikondisikan pada viabilitas yang tinggi, sehingga diperoleh jumlah populasi setelah dalam bentuk serbuk minimal  $10^7$  CFU/g.

Kurva pertumbuhan tersebut digunakan untuk penentuan fase-fase pertumbuhan kultur starter, sehingga dapat diperoleh kondisi kultur yang optimal untuk digunakan sebagai starter. Berdasarkan hasil penentuan waktu inkubasi yang optimum, lalu dilakukan perbanyakan bakteri *L.acidophilus* DLBSD102 untuk dipanen sel-selnya sebagai bahan baku pembuatan kultur starter susu fermentasi. Kurva pertumbuhan pada MRS broth dilakukan dengan menginokulasikan 1 mL indukan *L.acidophilus* DLBSD102 ke dalam 10 mL MRS broth dan diinkubasi suhu 37 °C, agitasi 200 rpm. Diukur kekeruhannya (OD) pada  $\lambda$  600 nm dan viabilitas bakteri dihitung dengan cawan tuang.

Kurva pertumbuhan pada media susu 100 mL dilakukan dengan cara, sebanyak 1 mL indukan *L.acidophilus* DLBSD102 hasil dari inkubasi pada MRS broth ditabung berbeda disentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit pada 4°C, kemudian dicuci satu kali menggunakan NaCl 0,85% (Oxoid) dengan cara disentrifugasi kembali (8000 rpm, 10 menit, 4°C) untuk mendapatkan pelet bakteri. Pelet bakteri yang diperoleh kemudian diinokulasikan pada media susu 100 mL, dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan agitasi 200 rpm, lalu diukur nilai pH dan viabilitas bakteri dengan cawan tuang pada pengenceran  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  menggunakan media MRS agar. Sampling dilakukan pada rentang waktu setiap 2 jam sekali selama 24 jam.

### Persiapan kultur probiotik dan produksi biomassa

Persiapan kultur probiotik dan produksi biomassa menggunakan isolat bakteri probiotik diregenerasi kedalam dua tabung reaksi, yang masing-masing berisi 10 mL media MRS *broth* (Merck) dari *research cell bank* (RCB) koleksi Lab Metabolic Engineering (MTE). Isolat diinkubasi pada suhu 37°C selama 22 jam. Biomassa dipanen dengan cara diambil sebanyak 15% dari kedua tabung reaksi lalu diambil pelet bakteri menggunakan alat sentrifugasi pada 8000 rpm selama 10 menit pada 4°C, kemudian dicuci satu kali menggunakan NaCl 0,85% (Oxoid) dengan cara disentrifugasi kembali (8000 rpm, 10 menit, 4°C).

### Pembuatan Kultur Starter dengan Probiotik Terenkapsulasi dalam Bentuk Serbuk

Pembuatan kultur diawali dengan menginokulasi bakteri *Lactobacillus acidophilus* DLBSD102 masing-masing sebanyak 1 mL indukan bakteri kedalam dua tabung reaksi yang berisi 10 mL media MRS *broth* kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 22 jam sesuai fase stasioner. Selesai waktu inkubasi, selanjutnya media *broth* diambil pelet bakteri di sentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit pada 4°C. Pelet bakteri kemudian dicuci dengan NaCl 0,85% (Oxoid) dan disentrifugasi kembali. Pelet bakteri kemudian ditambahkan ke media susu steril 100 mL dalam Erlenmeyer yang berisi larutan skim milk 12%, sukrosa 6% dan (ekstrak ragi 2% yang ditambahkan setelah inokulum dimasukkan). Selanjutnya, media susu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 22 jam dan diaduk dengan agitasi 200 rpm. Selesai masa inkubasi 22 jam kultur 100 mL kemudian, ditumbuhkan pada media susu bervolume 1.000 mL di dalam fermentor yang dilengkapi dengan *probe* termometer, *dissolved oxygen*, agitasi dan pH meter.

Hasil 1.000 mL dimasukkan ke dalam fermentor yang berisi media susu 10.000 mL dan diinkubasi kembali (seluruh proses inkubasi menggunakan suhu 4°C, dengan kecepatan putaran 200 rpm selama 22 jam). Selesai inkubasi 22 jam maka

bahan enkapsulan ditambahkan berupa malto deks -trin: *whey protein isolates*:inulin (3:1:1) dengan perbandingan kultur dan bahan enkapsulan (3:1), yang sudah disterilkan dan dicampur selama 10±20 menit agar homogen dan selanjutnya siap dipanen, dan dilakukan pengeringan semprot menggunakan *spray dryer* dengan suhu *inlet* 130°C dan suhu *outlet* 60 °C.

Kombinasi bahan enkapsulan dilakukan dengan menggunakan perbandingan (3:1:1), dengan mencampurkan karbohidrat dan protein sebagai bahan penyusunnya. Hasil terbaik didapat dari berbagai parameter uji, seperti viabilitas BAL dan uji ketahanan. Hasil menunjukkan bahwa kombinasi bahan enkapsulan berupa malto-dekstrin: *whey protein isolates*:inulin (3:1:1) paling cocok untuk mikroenkapsulasi *L.acidophilus* DLBS D102. Hal ini disebabkan viabilitas mikroenkapsulasi *L.acidophilus* DLBSD102 sangat tinggi dan paling stabil dibandingkan jika menggunakan bahan campuran lain.

### Penyimpanan dan Evaluasi Kualitas Serbuk Hasil Pengeringan Semprot serta Aplikasinya

Serbuk hasil pengeringan kering menggunakan *spray dryer* dikemas menggunakan kemasan *aluminium foil* berlapis plastik *low density polyethylene* (LDPE). Produk yang telah dikemas selanjutnya disimpan selama 4 minggu pada suhu 4 °C (suhu kulkas) dan suhu kamar (25°C). Kondisi ruangan penyimpanan memiliki kelembaban 60–66 % dengan suhu berkisar 27-29°C. Pengujian viabilitas kultur starter bakteri dalam serbuk yaitu meliputi penghitungan populasi bakteri asam laktat (BAL), *L. acidophilus* DLBS D102. Pengamatan hasil aplikasi serbuk meliputi aspek fisik-kimia dan mikrobiologi.

### Uji Kualitas Fisik Serbuk Kultur Starter Nilai pH (AOAC, 1994)

Pengukuran nilai pH media susu menggunakan pH meter yang dikalibrasi dan harus distandardisasi dengan larutan buffer pH 4, 7 dan 10 sebelum digunakan. Sampel sebanyak 5-10 mL diambil, kemudian elektroda dibilas dengan air akuades. Elektroda dikeringkan dengan kertas tissue

lalu dicelupkan kedalam sampel. Elektoda dibiarkan beberapa saat. Nilai pH yang dibaca adalah saat pH meter dalam keadaan stabil.

#### *Total Asam Titrasi (Fardiaz, 1992)*

Pengukuran total asam titrasi menggunakan prinsip metode titimetri asam basa. Sampel sebanyak 10 mL dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer kemudian ditambahkan 2-3 tetes indikator fenolftalein 1%. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda dan tidak hilang dalam waktu 30 detik. Kemudian dihitung jumlah total asam tertitirasi yang didapat.

$$\text{Total Asam Titrasi (\%)} = \frac{(V \times N) \text{ NaOH} \times \left(\frac{90}{1000}\right)}{\text{volume sampel} \times \text{FP}} \times 100$$

#### *Pengujian Kadar Air menggunakan Moisture Analyzer*

Pengujian kadar air dari serbuk menggunakan prinsip metode gravimetri menggunakan alat *Moisture Analyzer* Mettler Toledo tipe HR 83. Alat diposisikan dalam keadaan hidup dan pans penampung sudah tersedia dalam keadaan bersih dan sudah ditera. Sampel serbuk sebanyak  $\pm 2$  gram dimasukan kedalam pans lalu ditekan tombol *start*. Pengukuran didasarkan pada prinsip metode Gravimetri.

#### *Pengujian Bentuk dan Ukuran Serbuk (Lian et al, 2002)*

Bentuk dan diameter dari serbuk diperiksa menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM), dengan cara serbuk ditempatkan merata pada *aluminium stubs* yang berupa lempeng berdiameter 6 mm, kemudian divakum dengan gas argon sampai stabil dan dilapisi emas dengan *sputter coater* selama 20 detik. Selanjutnya *aluminium stubs* yang berisi sampel dimasukkan pada alat *electron microscope* dan diamati diameter serbuk serta bentuk mikroskopis dari serbuk.

#### *Penentuan Jumlah Koloni Kultur Starter dan Bakteri Probiotik*

Penentuan jumlah koloni kultur starter dan bakteri probiotik ditentukan dengan menggunakan metode hitungan

cawan. Penghitungan dan pengambilan data populasi dilakukan saat awal akan dilakukan proses pemindahan kultur starter dari media (MRS *broth*) ke media susu sampai proses penerangan semprot. Pengukuran viabilitas bakteri dilakukan dengan pengenceran bertingkat yakni sebanyak 1 mL inokulum dipipet ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan fisiologis *sodium peptone broth* steril. Penentuan viabilitas bakteri dengan metode cawan tuang

#### **Uji Mikrobiologi**

##### *Uji Ketahanan Probiotik terhadap Panas Selama Proses Pengeringan Semprot (Lian et al, 2002)*

Uji ketahanan probiotik selama pengeringan semprot dilakukan untuk mengetahui pengaruh proses pengeringan semprot dan bahan enkapsulasi terhadap jumlah probiotik yang masih tetap bertahan hidup. Ketahanan probiotik ditentukan dengan membandingkan jumlah sel sesudah pengeringan semprot dan jumlah sel sebelum pengeringan semprot. Penghitungan kuantitatif jumlah probiotik dilakukan dengan metode *plate count* (Lian et al, 2002). Ketahanan probiotik selama proses pengeringan semprot dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Ketahanan panas (\%)} = \frac{\log X \text{ sel sesudah pengeringan}}{\log X \text{ sel sebelum pengeringan}} \times 100$$

##### *Uji Ketahanan Probiotik terhadap pH 2 (Lian et al, 2003)*

Ketahanan probiotik pada pH 2 dinyatakan dalam persen jumlah yang tahan terhadap pH 2 dibandingkan jumlah pada kondisi normal (pH 7). Pengujian ketahanan terhadap pH 2 dilakukan menurut metode Lian et al. (2003), dengan cara sebanyak 1 gram serbuk dan 1 mL kultur dalam MRS *broth* yang sudah berumur 24 jam dimasukkan dalam 10 mL MRS *broth* kontrol dan MRS *broth* asam yang diatur pada pH 2 menggunakan HCl 37%, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 jam.

Selanjutnya dibuat seri pengenceran dengan metode cawan tuang. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada

kontrol dengan perlakuan. Semakin kecil selisih semakin tahan kultur bakteri asam laktat yang diuji terhadap pH 2. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Ketahanan (\%)} = \frac{\text{Log } \Sigma \text{ sel pada media pada pH 2}}{\text{Log } \Sigma \text{ sel pada media normal}} \times 100$$

#### Uji Ketahanan Probiotik terhadap Garam Empedu (Lian et al, 2003)

Uji terhadap garam empedu dilakukan menurut Lian et al. (2003), dan konsentrasi garam empedu yang digunakan 0,5% dengan penentuan akhir menggunakan metode hitungan cawan. Serbuk sebanyak 1 g dan 1 mL kultur dalam MRS broth yang sudah berumur 22 jam, dimasukkan dalam 10 mL MRS broth (kontrol) dan MRS broth yang berisi garam oxgal 0,5% (b/v) kemudian diaduk dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 3 jam, selanjutnya dibuat seri pengenceran dan dituang kedalam cawan petri dengan metode cawan tuang.

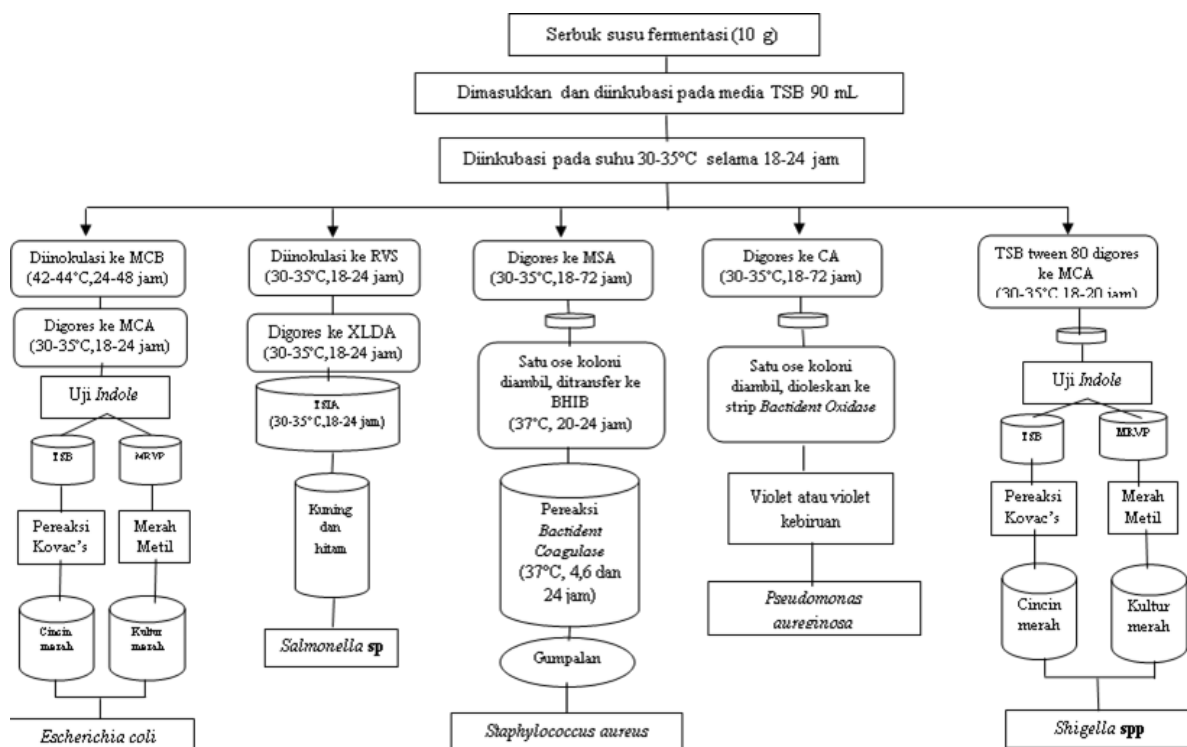
$$\text{Ketahanan (\%)} = \frac{\text{Log } \Sigma \text{ sel yang tumbuh pada media up}}{\text{Log } \Sigma \text{ sel yang tumbuh pada media normal}} \times 100$$

#### Total Bakteri Asam Laktat (IKU/M 32/05-08)

Sampel serbuk hasil pengeringan semprot ditimbang 25 gram secara aseptis kedalam *Erlenmeyer* yang berisi larutan *sodium peptone broth* yang ditambah Tween 80 steril, hingga diperoleh pengenceran 1:10. Larutan kemudian diaduk selama 20-30 menit menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen kemudian dilakukan pengenceran hingga 1:10<sup>8</sup>. Suspensi dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing pengenceran, kedalam cawan petri steril, selanjutnya dilakukan dengan metode cawan tuang.

#### Deteksi Bakteri Pencemar pada Produk Enkapsulasi

1. Bagan Pengujian Bakteri Pencemar pada Produk, sbb:



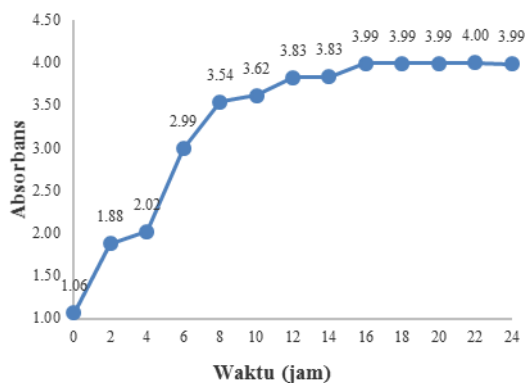
Gambar 1. Bagan Pengujian Bakteri Pencemar pada Produk



## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kurva Pertumbuhan Kultur Starter Bakteri Asam Laktat (BAL)

Kurva pertumbuhan mikroba menggunakan media MRS *broth* dan media susu selama 26 jam ditunjukkan pada Gambar 2 dan 3. Populasi awal kultur starter adalah antara  $10^5$ - $10^7$  CFU/mL. Hasil pengamatan diperoleh jumlah populasi bakteri kultur starter saat fase stasioner adalah antara  $10^8$ - $10^{10}$  CFU/mL, sesuai dengan persyaratan populasi mikroba kultur starter menurut Sultana *et al*, (2000), yaitu sebanyak  $10^7$  CFU/g di dalam produk akhir.



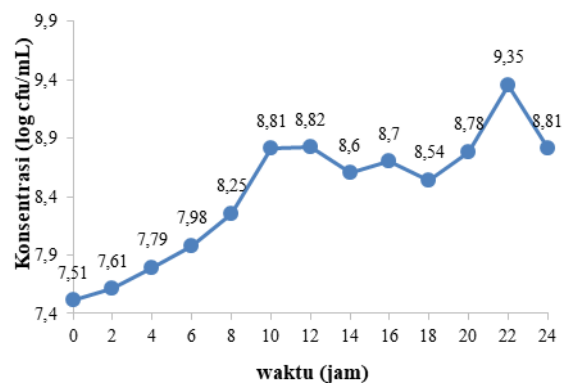
Gambar 2. Kurva Pertumbuhan BAL DLBSD102 dengan MRS *broth*

Pemanenan kultur starter pada fase stasioner bertujuan untuk mempersingkat waktu adaptasi kembali kultur starter pada saat akan diaplikasikan pada pembuatan produk, sehingga aktivitas metabolismenya diharapkan berlangsung dalam waktu yang relatif bersamaan. Pemanenan pada waktu 22 jam dilakukan saat viabilitas bakteri sangat tinggi, sebelum memasuki fase kematian.

Hal ini dilakukan karena bakteri ini mampu bertahan pada keadaan nutrisi mulai habis dan metabolit sekunder yang dihasilkan berupa asam laktat mampu menyeleksi bakteri yang tahan terhadap asam, sehingga saat difermentasikan dalam media susu, fase logaritmik akan berlangsung cepat karena jumlah bakteri yang digunakan sangat tinggi. Hasil yang didapat menunjukkan, pemanenan pada fase stasioner menghasilkan probiotik yang tahan

terhadap kondisi suhu panas, pH rendah, radiasi dan bahan kimia.

Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut dapat ditentukan waktu panen untuk menghasilkan kultur starter yang banyak yaitu pada waktu inkubasi 22 jam. Jumlah populasi *L.acidophilus* DLBSD102 yang dihasilkan sebesar  $10,13 \pm 1,10$  log CFU/mL. Pola pertumbuhan *L.acidophilus* DLBSD102 menghasilkan jumlah populasi awal (jam 0) sebesar 8,19 log CFU/mL, dengan konsentrasi sel  $5.36 \times 10^8$  sel/mL menggunakan media MRS *broth* dan 7,51 log CFU/mL pada media susu.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan BAL DLBSD102 dengan Media Susu

Fase stasioner akhir dicapai pada 22 jam dari kedua media pertumbuhan yang digunakan. Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut dapat ditentukan waktu panen untuk menghasilkan kultur starter kering berupa serbuk susu fermentasi yaitu pada 22 jam inkubasi, dengan populasi bakteri *L.acidophilus* DLBSD102 dengan jumlah populasi sebesar  $10,91$  log CFU/mL dengan jumlah konsentrasi sel sebesar  $2,0 \times 10^9$  sel/mL (media MRS *broth*) dan  $9,35$  log CFU/mL (media susu).

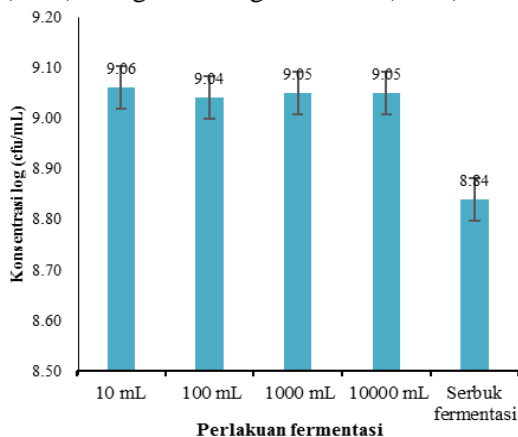
Perbedaan populasi bakteri *L.acidophilus* DLBSD102 diawal dan diakhir dari kedua media yang digunakan, disebabkan perbedaan komposisi media pertumbuhan yang digunakan. Bakteri tumbuh lebih cepat pada media MRS *broth* karena media ini merupakan media yang cocok untuk jenis bakteri *Lactobacillus*, sehingga bakteri yang ditumbuhkan mampu

berkembang secara optimum (Cowan, 1981).

### Pembuatan dan Pengeringan Kultur Starter Probiotik Hasil Fermentasi

Viabilitas bakteri dari serbuk susu dipertahankan dengan penambahan bahan enkapsulan. Menurut Kennedy *et al*, (1995), mikroenkapsulasi menggunakan maltodekstrin berfungsi sebagai bahan pengisi dan pembentuk tekstur yang dapat menyebabkan viskositas yang tinggi, sehingga mampu mengurangi kehilangan air selama dan setelah proses pengeringan. Selain itu, maltodekstrin mudah larut dan membantu proses penyebaran, sehingga bahan yang dikeringkan tidak lengket pada permukaan dinding mesin *spray dryer*.

Menurut Anal dan Singh (2007), untuk meningkatkan viabilitas bakteri selama proses pengeringan semprot, pengemasan dan penyimpanan, dapat ditambahkan bahan enkapsulan berupa prebiotik seperti polidektrosa, maltodekstrin, trehalosa, inulin, *wey protein isolate*, pati, xanthan gum, gum arab, fruktooligosakarida (FOS) dan galaktooligosakarida (GOS).



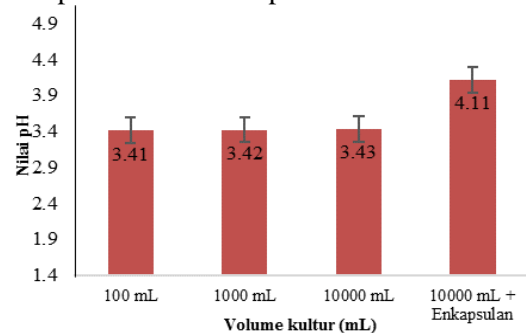
Gambar 4. Diagram Pertumbuhan BAL DLBSD102

Kombinasi bahan enkapsulan maltodekstrin:*wey protein isolate*:inulin (3:1:1) yang ditambahkan dalam mikroenkapsulasi mampu mempertahankan viabilitas bakteri, dan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan campuran bahan enkapsulan maltodekstrin: *wey protein isolate* (3:1). Penggunaan bahan enkapsulan tambahan berupa inulin mampu mempertahankan

viabilitas sel bakteri, dapat dilihat bahwa jumlah bakteri yang paling tinggi terdapat pada kultur yang ditambahkan campuran bahan enkapsulan maltodekstrin:*wey protein isolate*:inulin (3:1:1), kemudian dikeringkan dan penurunan viabilitas bakteri cukup rendah sebesar  $0,20 \pm 0,01$  log CFU/g dibandingkan dengan penambahan bahan enkapsulan berupa maltodekstrin: *wey protein isolate* (3:1), penurunannya sebesar  $0,51 \pm 0,36$  log CFU/g.

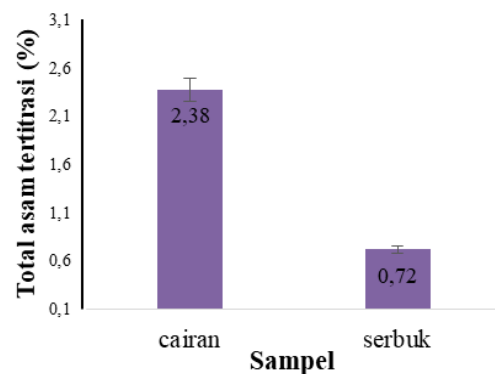
### Pengaruh Nilai pH dan Kadar Total Asam Tertitiasi terhadap Hasil Fermentasi

Nilai pH selama proses fermentasi dapat berubah karena aktivitas kultur starter bakteri, ketika proses fermentasi selesai, dan penambahan enkapsulan.



Gambar 5. Perubahan pH selama proses fermentasi

Menurut Nuraida *et al* (2012), proses penguraian karbohidrat menjadi asam laktat yang dapat meningkatkan nilai keasaman, sehingga menyebabkan terjadinya perubahan nilai pH.



Gambar 6. Pengukuran kadar Total Asam Tertitiasi (TAT)



Bakteri probiotik mengubah laktosa sebagai sumber karbohidrat menjadi asam laktat yang menurunkan nilai pH, sehingga kadar asam susu menjadi relatif tinggi dan terbentuk gumpalan (*curd*).

Total asam tertitrisasi dinyatakan sebagai persen asam laktat. Asam laktat adalah komponen asam terbesar yang terbentuk pada saat fermentasi susu berlangsung. Asam laktat ( $C_3H_6O_3$ ) mudah terdisosiasi menjadi ion  $H^+$  dan  $CH_3CHOHCOO^-$ . Kadar total asam laktat yang didapat dari sampel sebelum dan sesudah pengeringan semprot didapat bahwa kadar asam laktat dari sampel cairan yaitu sebesar 2,38 % atau sebelum pengeringan lebih tinggi, dibandingkan dengan sampel serbuk yaitu 0,72% setelah proses pengeringan. Hal ini dikarenakan komponen yang diukur dari total asam tertitrisasi yang ada dalam bentuk cairan lebih banyak sebelum dikeringkan, seperti air yang mengikat senyawaan asam, senyawa organik yang saling larut dan berikatan satu sama lain.

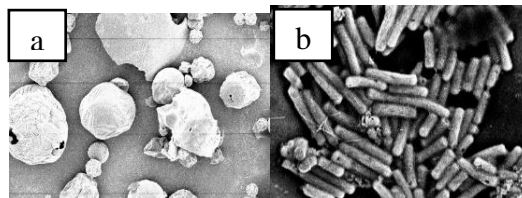
#### Pengaruh Penambahan Bahan Enkapsulan terhadap Kadar Air dari Susu Fermentasi

Kelangsungan hidup BAL banyak dipengaruhi oleh berbagai faktor selama proses pengemasan dan penyimpanan. Salah satunya adalah ketersediaan air dan oksigen (Anal dan Singh, 2007). Pada  $a_w$  rendah adalah kondisi air di dalam sel terikat sangat kuat, dan air tidak dapat digunakan dalam reaksi-reaksi kimia, sehingga aktivitas metabolisme tidak berjalan, dan mikroorganisme dalam kondisi dorman. Kadar air dan  $a_w$  yang tinggi, menyebabkan struktur sel rusak dan sel yang lisis meningkat. Jika kultur kering yang ditumbuhkan kembali pada media sesuai, maka aktivitas sel akan kembali berlangsung.

#### Karakterisasi Hasil Enkapsulasi *L.acidophilus* DLBSD102

Berdasarkan hasil SEM dengan perbesaran 2200x untuk bahan enkapsulan, dan 370x untuk sel bakteri, didapat bentuk yang seragam sedangkan untuk serbuk hasil mikroenkapsulasi berbentuk sedikit kasar

(*crumble*) dan seragam. Hal ini disebabkan oleh pencampuran bahan enkapsulan dengan ukuran partikel yang berbeda, yang menyebabkan ketika proses pengadukan seluruh bahan tercampur dan partikel yang paling besar akan menyalut partikel kecil seperti sel bakteri. Sel bakteri berada didalam bahan enkapsulan, sehingga tidak terlihat bila sudah dikeringkan.



keterangan:

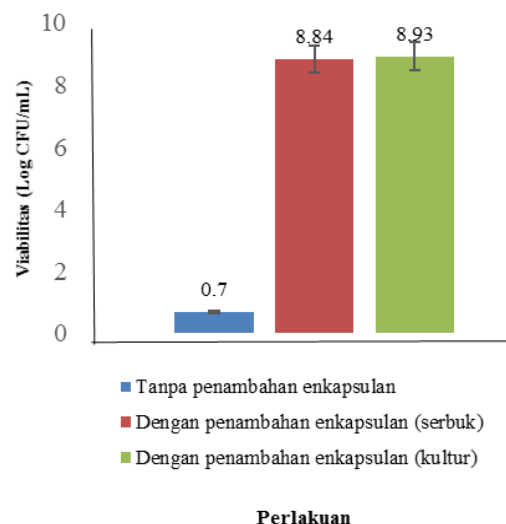
a : Serbuk susu fermentasi

b: Sel bebas *L.acidophilus* DLBSD102

Gambar 7. Hasil SEM berbagai bahan penyusun susu fermentasi

#### Pengaruh Penambahan Bahan Enkapsulan pada BAL Terenkapsulasi terhadap Suhu Panas, Garam Empedu dan pH 2

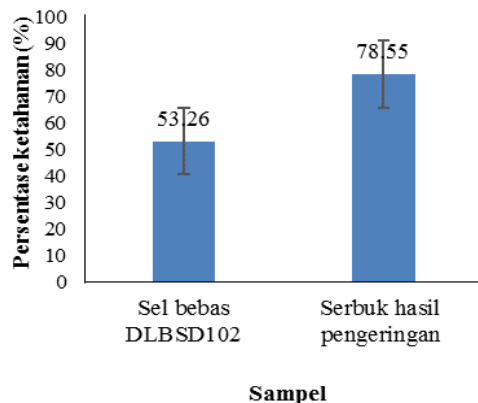
Hasil pengujian ketahanan probiotik terenkapsulasi terhadap panas, selama proses pengeringan semprot dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Ketahanan Probiotik terhadap Suhu Panas

Setelah dilakukan pengeringan pada suhu *inlet* 130°C jumlah probiotik mengalami penurunan sebesar  $0,09 \pm 0,03$

log CFU/mL dari jumlah awal kultur sebesar 8,93 log CFU/mL menjadi 8,84 log CFU/mL. Selisih tersebut sangat kecil karena penurunannya tidak sampai 1 log CFU/mL dan viabilitas bakteri masih  $> 7$  log CFU/mL.



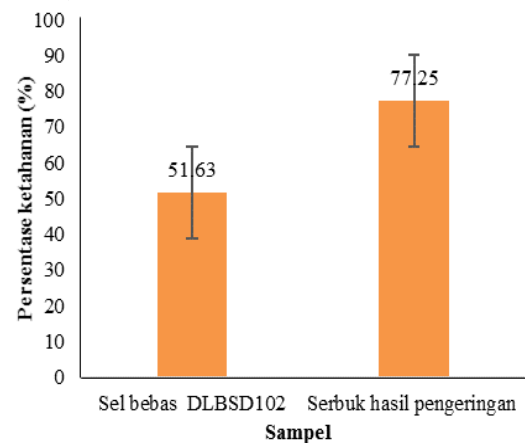
Gambar 9. Diagram Ketahanan Probiotik terhadap Garam Empedu (*Bile Salt*)

Menurut Smet *et al*, (1995) golongan *Lactobacillus* memiliki enzim *bile salt hydrolase* (BSH) yang mampu mengkonjugasi garam empedu tinggi, sehingga tidak bersifat racun bagi BAL. Konsentrasi garam empedu yang tinggi menyebabkan jumlah sel *Lactobacillus* yang mati juga akan meningkat (Ngatirah *et al*, 2000; Kusumawati, 2002). Penambahan bahan enkapsulan mampu melindungi probiotik pada kondisi pH 2.

Bahan enkapsulan yang menghasilkan proteksi yang paling baik adalah kombinasi bahan enkapsulan maltodekstrin:*whey protein isolate*:inulin (3:1:1) dengan penurunan hanya sebesar  $0,20 \pm 0,01$  log CFU/g, dibandingkan dengan campuran bahan enkapsulan maltodekstrin:*whey protein isolate* sebesar  $0,51 \pm 0,36$  log CFU/g. Mikroenkapsulasi meningkatkan kemampuan ketahanan sel probiotik dibandingkan sel probiotik bebas terhadap garam empedu (0,5%). Pada sel bebas, jumlah sel mengalami penurunan cukup besar yakni sebesar  $3,87 \pm 0,19$  log CFU/mL, sedangkan viabilitas sel yang dimikroenkapsulasi dapat bertahan dan mengalami penurunan jumlah sel yang lebih sedikit, yakni  $1,65 \pm 0,31$  log CFU/mL. Bahan enkapsulan yang menghasilkan

proteksi terhadap garam empedu yang paling baik adalah kombinasi dari bahan enkapsulan maltodekstrin:*whey protein isolate*:inulin (3:1:1).

Menurut Roberfroid (2007), prebiotik merupakan bahan pangan fungsional, yang sulit dicerna (*indigestible*) dalam usus halus. Kriteria prebiotik untuk mikroenkapsulasi, diantaranya tidak dapat dihidrolisis atau diabsorpsi oleh sistem pencernaan bagian atas, dapat difermentasi pada usus besar oleh bakteri yang bermanfaat bagi kesehatan, mampu mengatur komposisi mikroflora pada usus besar inangnya, dengan cara meningkatkan jumlah bakteri menguntungkan dan menurunkan jumlah bakteri patogen (Kolida, 2007).



Gambar 10. Diagram Ketahanan Probiotik terhadap pH 2

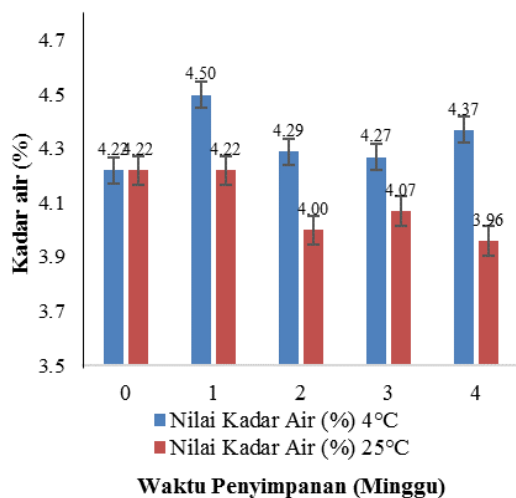
Ketahanan probiotik terhadap pH 2 dan garam empedu lebih baik ketika sel dimikroenkapsulasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Reddy *et al*, (2009) yang menyatakan bahwa maltodekstrin yang ditambahkan sebagai bahan enkapsulan selama proses mikroenkapsulasi, mampu mempertahankan viabilitas dan sifat probiotik *L. plantarum* terhadap asam dan ketahanan terhadap garam empedu.

#### Pengaruh Penambahan Bahan Enkapsulan terhadap Penyimpanan

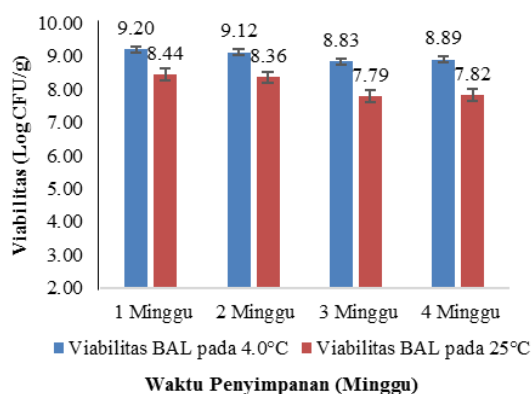
Penyimpanan sampel pada suhu 4°C dan 25°C mampu mempertahankan viabilitas bakteri, dengan jumlah BAL melebihi batas yang ditetapkan oleh *International Dairy Federation* sebesar log

7,0 CFU/g. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu penyimpanan 4°C lebih baik digunakan untuk jangka panjang, dalam mempertahankan viabilitas BAL.

Penyimpanan sampel pada suhu 4°C dan 25°C mampu mempertahankan viabilitas bakteri, dengan jumlah BAL melebihi batas yang ditetapkan oleh *International Dairy Federation* (IDF) sebesar log 7,0 CFU/g. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu penyimpanan 4°C lebih baik digunakan untuk jangka panjang dalam mempertahankan viabilitas BAL. Bila dibandingkan pada suhu 25°C, reaksi-reaksi enzimatik, kimiawi dan biokimia sel dapat terhambat. Untuk pemeliharaan dan penyimpanan bakteri *Lactobacillus* dianjurkan pada suhu 4-7°C.



Gambar 11. Diagram Kadar Air Selama Proses Penyimpanan



Gambar 12. Diagram Viabilitas BAL Selama Penyimpanan pada (4°C/5%) dan suhu (25°C/60%)

Menurut Desmond *et al*, (2002) menyatakan bahwa viabilitas serbuk probiotik akan mengalami penurunan seiring dengan meningkatnya suhu penyimpanan. Pada penyimpanan panas terjadi dehidrasi sel, sel menderita *shock osmotic* dan lisis. Suhu panas merusak berbagai struktur sel seperti membran sel, ribosom, DNA, RNA dan enzim. Oleh karena itu, penyimpanan pada suhu tinggi tidak dianjurkan pada produk probiotik, baik dalam bentuk cair ataupun kering. Menurut IDF, jumlah minimal sel probiotik hidup yang berperan dalam meningkatkan kesehatan pencernaan adalah sebanyak  $10^6$ - $10^7$  CFU/g.

Suhu penyimpanan 25°C pada sampel, tetap memberikan manfaat kesehatan, seperti meningkatnya sistem imun saluran pencernaan selama disimpan 4 minggu. Namun, untuk konsumsi dibutuhkan dosis 3 kali lebih banyak jika disimpan pada suhu 25°C dibandingkan dengan 4°C. Satu sifat penting dari kultur yang digunakan sebagai tambahan pangan adalah organisme tersebut harus tetap hidup selama penyimpanan sebelum dikonsumsi.

### Evaluasi Bakteri Pencemar terhadap Kualitas Serbuk Susu Fermentasi

Pengujian terhadap mikroba pencemar dilakukan terhadap susu fermentasi, bakteri-bakteri pencemar yang diidentifikasi merupakan bakteri yang tergolong Famili Enterobacteriaceae (*E.coli*, *Salmonella* sp dan *Shigella* spp) dan bakteri *P.aureginosa*, *S.aureus*. Adanya bakteri pencemar pada bahan pangan mengindikasikan adanya mikroorganisme enteropatogenik atau enterotoksi-genik yang berbahaya bagi kesehatan serta proses sanitasi yang kurang baik.

Kontaminasi mikroba-mikroba berbahaya bisa saja berasal dari tempat, pekerja dan lingkungan selama proses produksi, pengemasan, penyimpanan dan proses analisis yang tidak higienis dan tidak aseptis. Hal ini sangat penting untuk diperhatikan, karena susu fermentasi sebagai bahan pembuatan serbuk susu fermentasi merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba patogen. Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh bahwa tidak ada koloni bakteri patogen ketika di inkubasi

pada media agar selektif, dan tidak perlu dilakukan proses pengayaan dengan media selektif lainnya, karena tidak ada pertumbuhan koloni bakteri patogen dari media uji yang selektif dan spesifik.

## KESIMPULAN

Proses mikroenkapsulasi menggunakan perbandingan bahan enkapsulan dari maltodekstrin: *whey protein isolate*:inulin (3:1:1) metode pengeringan semprot pada produk serbuk susu fermentasi, mampu menjaga dan mempertahankan viabilitas *L.acidophilus* DLBSD102. Perbandingan bahan enkapsulan mampu menghasilkan viabilitas yang lebih tinggi sebesar  $8,84 \pm 0,03$  log CFU/mL, dibandingkan dengan serbuk susu fermentasi yang dienkapsulasi tanpa penambahan inulin seperti malto-dekstrin:*whey protein isolate* (3:1) sebesar  $8,48 \pm 0,51$  log CFU/mL dengan selisih penurunan viabilitas sebesar  $0,31 \pm 0,24$  log CFU/mL. Proses mikroenkapsulasi mampu meningkatkan ketahanan sel probiotik *L. acidophilus* DLBSD102 terhadap panas, garam empedu, pH 2. Viabilitas bakteri mampu bertahan selama proses produksi, penyimpanan dan sampai ke saluran pencernaan dengan hasil parameter memenuhi syarat SNI-01-2970-2006 tentang susu serbuk.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada PT *Dexa Laboratories of Biomolecular Sciences* (DLBS) yang telah memberikan kesempatan untuk belajar, bekerja dan melakukan penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

Anal, A.K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted deliver. *Trends Food Sci Technol* 18:240-252. DOI :10.1016/j.tifs.2007.01.004.

AOAC. (1994). *Official Method of Analysis*. 16<sup>th</sup> Edition. Association of Official Analytical Chemistry International, Gaithersburg.

Cowan, S.T. (1981). *Manual for Identification of Medical Bacteria*. USA: Cambridges University Press.

Desmond, C., Stanton, C., Collins, G.F.K & Ross, R.P. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray dried powders containing gum acacia. *J Appl Microbiol*, 93, 1003-1012.

Fardiaz, S. (1992). *Petunjuk Laboratorium Mikrobiologi Pengolahan Pangan*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.

Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*. 32, 439-442.

Jiang, Y., Zheng, Z., Zhang, T., Hendricks, G. & Guo, M. (2016). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCFM using polymerized whey proteins as wall material. *University of Vermont, Burlington USA: Food Sciences and Nutrition*. Taylor and Francis Publishers.

Kennedy, J.F. Knill, C.J & Taylor, D.W. (1995). Dalam Keasley, M.W., Dziedzic, S.Z. (Eds), *Handbook of Hydrolysis Product and Their Derivatives Maltodextrins* London: Blackie Academic and Profesional. Hlm 65-82.

Kondo. (1979). *Microcapsule Processing and Technology*. New York: Marcel Dekker.

Kolida, S., and Gibson, G.R. (2007). Prebiotic capacity of inulin- type fructans. *Journal of Nutrition*, 137, 2503S-2506S.

- Kusumawati, N. (2002). *Seleksi bakteri asam laktat indigenus sebagai genus probiotik dengan kemampuan mempertahankan keseimbangan mikroflora feses dan mereduksi kolesterol serum darah tikus*. (Tesis). Ilmu Pangan. Program Pasca Sarjana. IPB, Bogor.
- Lian, W.C., Hsio, H.C. and Chou, C.C. (2002). Survival of *Bifidobacterium longum* after spray drying. *Int J Food Microbiol*, 74,79– 86.
- Lian, W.C., Hsio, H.C. & Chou, C.C. (2003). Viability of microencapsulated *Bifidobacteria* in simulated gastric juice and bile solution. *Int J Food Microbiol*, 86, 293-301.
- Ngatirah, E., Harmayani, E.S., Rahayu & Utami, T. (2000). Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. Prosidium Seminar Nasional (63-78).
- Nuraida, L., Hana, A.W., Hartanti, & Prangdimurti E. (2012). Potensi *Lactobacillus* yang diisolasi dari air susu ibu untuk mencegah diare. *J Teknologi dan Industri Pangan XXIII* (2). DOI :10.6066/JTIP.2012.23.2.158.
- Pedretti, S. (2013). Probiotic market: up or down?. *Nutrafoods* 12:N18-N19. DOI 10.1007/s13749-013-0006-x.
- Reddy, K.B.P.K., Madhu, A.N. and Prapulla, S.G. (2009). Comparative survival and evaluation of functional probiotics properties of spray-dried lactic acid bacteria: Original Research. *Int J of Dairy Technology*, 62, 240-248.
- Roberfroid, M.B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, 137 (11), 2493S-2502S.
- Salminen, S., and von Wright, A. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. Edisi ke -2. New York: Marcel Dekker Inc.
- Smet, I.D., Hoorde, L. V., Woestyne, M.V., Christiaens, H., dan Verstraete. (1995). Significance of bile salts hydrolytic activities of *Lactobacilli*. *Journal Applied Bacteriology*, 79,292-301.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., and Kailasapath, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastro intestinal condition and in yoghurt. *Int J Food Microbiol*, 62, 47-55.
- Soukoulis, C., Jobbehdar, S.B., Yonekura, L., Parmenter, C. & Fisk, I. (2013). Impact of Milk Protein Type on the Viability and Storage Stability of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using Spray Drying. *United Kingdom: Food Bioprocess Technol*, 7, 1255-1268.
- Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C. & Fisk, I. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *United Kingdom: Functional Foods. Elsevier Sciences Publishers*.
- Young, S.L., Sarda, X. & Rosenberg, M. (1993). Microencapsulation Properties of Whey Proteins. 1. Microencapsulation of Anhydrous Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 76, 2868-2877.